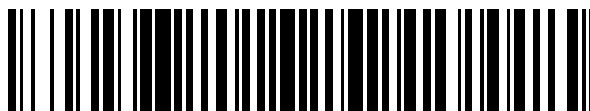


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 003**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
A61K 8/65 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2011** **PCT/JP2011/063704**
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011** **WO11158864**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2011** **E 11795768 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016** **EP 2583977**

54 Título: **Colágeno modificado con retinol, método para producir el mismo, y composición externa para la piel que lo contiene**

30 Prioridad:

15.06.2010 JP 2010136293

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2016

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NARA
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
(50.0%)
8916-5, Takayamacho
Ikoma-shi, Nara 630-0192, JP y
SUNSTAR INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TANIHARA, MASAO;
TAKAICHI, KANA;
MAEDA, MARIKO;
MITSUI, TSUKASA;
YAMAMOTO, KAZUSHI y
HIRANO, AKIKO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 589 003 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Colágeno modificado con retinol, método para producir el mismo, y composición externa para la piel que lo contiene

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a colágeno modificado con retinol que presenta efectos excelentes de antienvjecimiento cutáneo cuando se aplica a la piel. De forma más específica, la presente invención se refiere a un colágeno modificado con retinol que tiene una toxicidad baja para las células y tiene una seguridad excelente sin causar picores y similares, aumenta la expresión de los genes de ácido hialurónico sintasa durante un periodo de tiempo prolongado y aumenta la producción de ácido hialurónico, y también aumenta la síntesis de colágeno, para producir de ese modo un efecto excelente de prevenir la formación de arrugas, un efecto excelente de mejorarlas arrugas, un efecto excelente de hacer que la piel sea bonita y un efecto excelente de mejorar la calidad de la piel; un método para producir el mismo, y una composición externa para la piel y un cosmético en forma de lámina cada uno conteniendo el mismo.

Descripción de la técnica relacionada

Las arrugas en la piel aumentan a medida que la piel envejece. Hay arrugas, por ejemplo, arrugas horizontales finas que se desarrollan de una manera tan profunda como la epidermis debajo de los ojos (las arrugas de la epidermis), arrugas que se desarrollan de una manera tan profunda como la dermis y aparecen como pliegues finos que se desarrollan verticalmente a los músculos mímicos en las esquinas de los ojos, la frente y similares (arrugas de la dermis), y arrugas que aparecen como enormes pliegues alrededor de los ojos y la boca, en los contornos de la cara y similares (arrugadas de edad avanzada). Sin embargo, no se han producido contramedidas que actué en preforma integral en partes tales como la epidermis y la dermis, y que proporcionen una solución de múltiples fases para evitar la formación de arrugas y para mejorar las arrugas.

Al mismo tiempo, el colágeno o sus derivados son proteínas fibrosas que se pueden encontrar en todos los organismos pluricelulares, y se incorporan en diversos productos cosméticos con el fin de prevenir el envejecimiento cutáneo.

Sin embargo, el colágeno convencional o los derivados de colágeno presentan el problema de que no son capaces de producir efectos antienvjecimiento cutáneo excelentes y satisfactorios.

Por consiguiente, en vista de los problemas existentes del colágeno, los inventores de la presente invención han completado una invención relacionada con polipéptidos que tienen una estructura similar a la del colágeno, y presentaron una solicitud para la invención (WO 2009/035092).

Por otro lado, el retinol y sus derivados son un tipo de vitamina conocida por estar involucrada con el mantenimiento, por ejemplo, defunciones vitales que incluyen la percepción visual y las funciones reproductoras de los tejidos epiteliales normales tales como piel y membranas mucosas. Se conocen como productos farmacéuticos para uso externo para enfermedades cutáneas por disqueratosis tales como ictiosis vulgar. Además, se sabe que algunos derivados del retinol suprimen el envejecimiento de la piel mediante el mantenimiento de las actividades de los tejidos epiteliales y la identificación sistemática de la transmisión de señales de luz ultravioleta, y se usan ampliamente como cosméticos para la prevención del envejecimiento cutáneo.

Sin embargo, el retinol informado de forma convencional es tóxico para las células, y los efectos de antienvjecimiento cutáneo mostrados por algunos derivados del retinol no se pueden mantener durante un periodo de tiempo prolongado. Por lo tanto, la prevención o la mejora de múltiples fases de las arrugas no se pueden realizar. Por lo tanto, se ha deseado el desarrollo de derivados de retinol más eficaces y el desarrollo de principios activos en lugar de retinol o sus derivados.

D. Swatschek *et al.* (2002, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics) divulgan una preparación de micropartículas de colágeno usando colágeno de esponja marina y la posterior adsorción de retinol *todo-trans*.

O. Sorg *et al.* (2006, Dermatologic Therapy) divulgan estudios terapéuticos y cosmeceúticos en retinoides, y que el mecanismo de acción implica la unión a receptores nucleares.

El documento JP 2009-67727 divulga un polipéptido de colágeno al que se une un péptido bioactivo que tiene un efecto supresor de las arrugadas a través de un ácido dicarboxílico.

Sumario de la invención

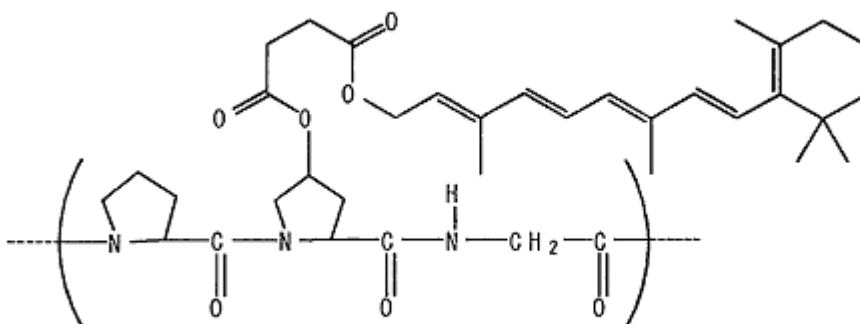
Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto que mantenga, durante un periodo de tiempo prolongado, una característica de seguridad mayor, un mayor efecto de prevención de la formación de arrugas, un mayor efecto de mejora de las arrugas, un mayor efecto de hacer que la piel sea bonita y un mayor efecto de mejora de la calidad de la piel que el retinol y los derivados de retinol convencionales, y proporciona una prevención o mejora de múltiples fases de las arrugas; un método para producir el mismo, y una composición externa para la piel y un cosmético en forma de lámina cada uno conteniendo al mismo como un principio activo.

Los inventores de la presente invención han hecho estudios intensos para resolver los problemas como se ha descrito anteriormente y encontraron que una sustancia, que se obtiene mediante la unión de retinol a un polipéptido (agregado fibroso) preparado por condensación de unidades peptídicas cada una con una secuencia de aminoácidos en particular, tiene toxicidad celular baja, no genera citoquinas inflamatorias, aumenta la producción de ácido hialurónico en la epidermis, estimula la síntesis de colágeno en la dermis, y por lo tanto es capaz de ejercer tales efectos excelentes. El hallazgo ha conducido a la finalización de la presente invención.

En otras palabras, la presente invención proporciona:

[1] Un colágeno modificado con retinol que comprende una unidad peptídica representada por la fórmula (2):

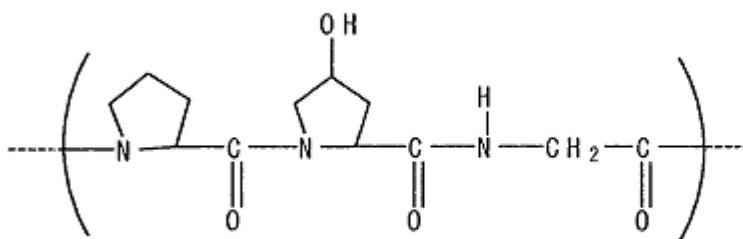
[Fórmula Química 1]



(2) .

y que opcionalmente también comprende al menos un tipo de una unidad peptídica representada por la fórmula (3):

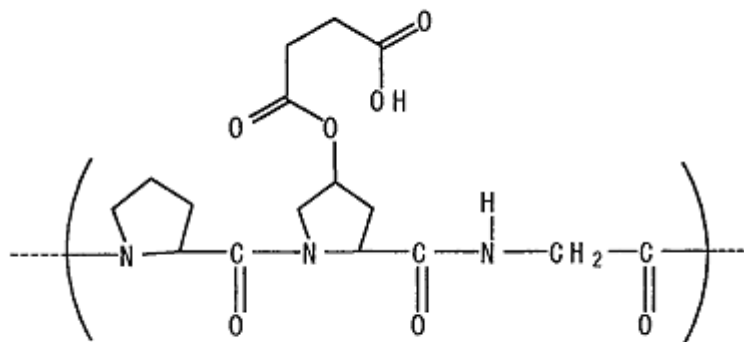
[Fórmula Química 2]



(3)

y una unidad peptídica representada por la fórmula (4):

[Fórmula Química 3]



(4) .

[2] El colágeno modificado con retinol de acuerdo con [1] que comprende al menos un tipo de una unidad peptídica representada por la fórmula (3) o la fórmula (4), donde una proporción del contenido entre la unidad peptídica representada por la fórmula (2), y la unidad peptídica representada por la fórmula (3) y la unidad peptídica representada por la fórmula (4) está, en términos de proporción molar, en el intervalo de (2) : ((3) + (4)) = 1 : 99 a 100 : 0.

[3] El colágeno modificado con retinol de acuerdo con uno cualquiera de [1] o [2], donde el pico de distribución de peso molecular entra dentro del intervalo de peso molecular de 500 a 1.000.000.

[4] El colágeno modificado con retinol de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], que es:

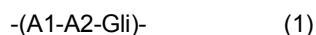
un agente para prevenir la formación de arrugas; y/o un acelerador de la producción de ácido hialurónico; y/o un agente de activación para la ácido hialurónico sintasa; y/o un acelerador de la producción de colágeno.

[5] Un método para producir el colágeno modificado con retinol de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], que comprende:

(1) preparar colágeno conjugado con ácido dicarboxílico mediante unión de ácido succínico o su anhídrido al menos a un grupo hidroxilo del colágeno; y a continuación

(2) unir el retinol a un grupo carboxilo del ácido succínico del colágeno conjugado con ácido dicarboxílico.

[6] El colágeno modificado con retinol de acuerdo con [1] o el método para su producción de acuerdo con [5], donde el colágeno es uno o más tipos seleccionados del grupo que consiste en colágeno natural y colágeno que contiene una unidad peptídica representada por la fórmula (1):



(donde Gli representa glicina, y A1 y A2 representan glicina, prolina (Pro) o hidroxiprolina (Hip), con la condición de que al menos uno de A1 y A2 sea Hip), gelatina, y un hidrolizado de colágeno natural y un hidrolizado de colágeno que contiene una unidad peptídica representada por la fórmula (1).

[7] El método de producción de acuerdo con uno cualquiera de [5] o [6], donde una amina terciaria se usa como un disolvente en la etapa (2).

[8] El método de producción de acuerdo con [7], donde la amina terciaria es una trialquilamina.

[9] El método de producción de acuerdo con [8], donde la trialquilamina es diisopropiletilamina.

[10] Una composición externa para la piel que comprende, como un principio activo, el colágeno modificado con retinol de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4].

[11] Una composición externa para la piel que comprende el colágeno modificado con retinol de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4] en una cantidad de un 0,00001 a un 30 % en peso basándose en la cantidad de la composición total.

[12] La composición externa para la piel de acuerdo con [10] o [11], que se usa para prevenir la formación de arrugas.

[13] Un cosmético en forma de lámina que comprende el colágeno modificado con retinol de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4].

El nuevo colágeno modificado con retinol de la presente invención es excelente en una característica de seguridad, en compatibilidad con la piel y actúa en la piel de una manera sostenida para ejercer de forma continua un efecto excelente y de múltiples fases de prevención de la formación de arrugas, a un efecto excelente y de múltiples fases

de mejora de las arrugas, un efecto excelente y de múltiples fases de hace que la piel sea bonita y un efecto excelente y de múltiples fases de mejora de la calidad de la piel. Tal colágeno modificado con retinol se puede usar de forma adecuada, en un solo compuesto, como un agente para prevenir la formación de arrugas, agente para mejorar las arrugas, un agente para hacer de la piel sea bonita, un agente para mejorar la calidad de la piel, un agente para estimular la producción de ácido hialurónico, un agente para activar la ácido hialurónico sintasa y un agente para estimular la producción de colágeno. Además, el colágeno modificado con retinol es adecuado para uso como un principio activo de composiciones extremas para piel, por ejemplo, composiciones externas para la piel para prevenir la formación de arrugas, mejorar las arrugas, hace que la piel sea bonita, y mejorar la calidad de la piel, cosméticos en forma de lámina y similares.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1A es una figura que muestra un efecto producido por el colágeno modificado con retinol de la presente invención y un efecto producido por derivados de retinol convencionales en la expresión de genes de la ácido hialurónico sintasa (HAS2) (Ejemplo Experimental 1).

La Fig. 1B es una figura que muestra un efecto producido por el colágeno modificado con retinol de la presente invención y un efecto producido por derivados de retinol convencionales en la expresión de genes de la ácido hialurónico sintasa (HAS3) (Ejemplo Experimental 1).

La Fig. 2 es una figura que muestra un efecto producido por el colágeno modificado con retinol de la presente invención y un efecto producido por una mezcla de derivados de retinol/colágeno en la expresión de los genes de la ácido hialurónico sintasa (HAS2 y HAS3) (Ejemplo Experimental 2).

La Fig. 3 es una figura que muestra un efecto producido por el colágeno modificado con retinol de la presente invención y un efecto producido por una mezcla de retinol/colágeno en la capacidad de supervivencia de queratinocitos epidérmicos humanos (Ejemplo Experimental 3).

La Fig. 4 es una figura que muestra un efecto producido por el colágeno modificado con retinol de la presente invención y un efecto producido por derivados de colágeno en la cantidad de producción de IL-8 en un cultivo de monocapa de queratinocitos epidérmicos humanos (Ejemplo Experimental 4).

La Fig. 5 es una figura que muestra un efecto producido por el colágeno modificado con retinol de la presente invención y un efecto producido por retinol en la cantidad de producción de IL-8 en epidermis cultivada tridimensional humana (Ejemplo Experimental 5).

La Fig. 6 es una figura que muestra un efecto producido por el colágeno modificado con retinol de la presente invención y un efecto producido por retinol en la cantidad de producción de ácido hialurónico en epidermis cultivada tridimensional humana (Ejemplo Experimental 6).

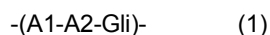
La Fig. 7 es una figura que muestra un efecto producido por el colágeno modificado con retinol de la presente invención y un efecto producido por retinol en la cantidad de síntesis de colágena de tipo 1 en epidermis cultivada tridimensional humana con dermis (Ejemplo Experimental 7).

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona el nuevo colágeno modificado con retinol como se establece en la reivindicación 1.

El colágeno modificado con retinol de la presente invención es colágeno en el que el retinol se esterifica a través de un ácido dicarboxílico con al menos un grupo hidroxilo de un resto de aminoácido que constituye el colágeno.

Algunos ejemplos de colágeno que constituye el colágeno modificado con retinol de la presente invención incluyen colágeno natural, colágeno que contiene una unidad peptídica representada por la fórmula (1) :



(donde Gli representa glicina, y A1 y A2 representan glicina, prolina (Pro) o hidroxiprolina (Hip), con la condición de que al menos uno de A1 y A2 sea Hip), gelatina, y un hidrolizado de colágeno natural y un hidrolizado de colágeno que contiene una unidad peptídica representada por la fórmula (1).

De estos tipos, el colágeno que contiene una unidad peptídica representada por la fórmula (1) (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "colágeno sintético") se puede preparar por disolución de uno o más tipos de unidades peptídicas seleccionadas entre Gli-Hip-Gli-, Pro-Hip-Gli-, Hip-Gli-Gli- e Hip-Pro-Gli- en una solución tampón adecuada, añadiendo un adyuvante de condensación tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) a la solución resultante, añadiendo adicionalmente un agente de condensación de deshidratación tal como clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida con refrigeración a la resolución resultante, y dializando la solución de reacción obtenida por agitación de la solución resultante con respecto a agua o a una solución tampón adecuada.

La reacción de condensación del colágeno sintético que se puede usar en la presente invención se puede realizar en un disolvente que sea capaz de disolver o suspender (disolver toda o una parte de) la unidad peptídica como se ha descrito anteriormente, y normalmente se puede usar una solución tampón. Algunos ejemplos de la solución tampón que se puede usar incluyen una solución de tampón fosfato, una solución de tampón carbonato y similares. Además,

también se puede usar un disolvente no acuoso que no contenga agua.

Algunos ejemplos del adyuvante de condensación que se puede usar en la reacción de condensación del colágeno sintético incluyen, además de N-hidroxitriazoles tales como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como se ha descrito anteriormente, imidas de ácido carboxílico polivalente de N-hidroxi [por ejemplo, imidas de ácido N-hidroxicarboxílico tales como N-hidroxisuccinimida (HONSu) e imida de ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB)], triazinas tales como 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazina (HOOBt), un éster de etilo del ácido 2-hidroxiimino-2-cianoacético, y similares. Estos adyuvantes de condensación se pueden usar independientemente o en combinación de dos o más tipos de los mismos. Algunos adyuvantes de condensación preferentes son los N-hidroxibenzotriazoles tales como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt).

La cantidad del adyuvante de condensación a usar es, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 5 moles, preferentemente de aproximadamente 0,1 a 2 moles, y más preferentemente de aproximadamente 0,15 a 1 mol basándose en 1 mol de la unidad peptídica independientemente del tipo de un disolvente acuoso o no acuoso.

Algunos ejemplos del agente de condensación de deshidratación que se puede usar en la reacción de condensación del colágeno sintético incluyen, además del clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (WSCl·HCl) como se ha descrito anteriormente, agentes de condensación basados en carbodiimida [tales como diisopropilcarbodiimida (DIPC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC=WSCI), y diciclohexilcarbodiimida (DCC)], agentes de condensación basados en fluorofosfato [tales como hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidinofosfonio, y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP)], azida de difenilfosforilo (DPPA), y similares. Estos agentes de condensación de deshidratación se pueden usar independientemente o en combinación con dos o más tipos de los mismos. Algunos agentes de condensación de deshidratación preferentes son agentes de condensación basados en carbodiimida tales como clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.

Dado que el agente de condensación de deshidratación se desactiva con el agua, la cantidad del agente de condensación de deshidratación a usar, cuando se usa un disolvente acuoso que contiene agua, por lo general es de aproximadamente 2 a 500 moles (por ejemplo, de aproximadamente 2 a 50 moles), preferentemente de aproximadamente 5 a 250 moles (por ejemplo, de aproximadamente 5 a 25 moles), y más preferentemente de aproximadamente 10 a 125 moles (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 20 moles) basándose en 1 mol de la unidad peptídica. Por otro lado, cuando se usa un disolvente no acuoso que no contiene agua, la cantidad del agente de condensación de deshidratación a usar es de aproximadamente 0,7 a 5 moles, preferentemente de aproximadamente 0,8 a 2,5 moles, y más preferentemente de aproximadamente 0,9 a 2,3 moles (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 2 moles).

En la reacción de condensación para producir el colágeno sintético, el pH del sistema de reacción se puede ajustar, o se puede añadir una base que no esté implicada en la reacción. El ajuste del pH normalmente se puede realizar usando una base inorgánica [tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato sódico, o hidrogenocarbonato sódico], una base orgánica, un ácido inorgánico [tal como ácido clorhídrico], o un ácido orgánico, y la solución de reacción normalmente se ajusta hasta una condición casi neutra (pH de aproximadamente 6 a 8). Algunos ejemplos de la base que no está implicada en la reacción incluyen amina terciarias, por ejemplo, trietilaminas tales como trimetilamina, trietilamina, y diisopropilamina; aminas terciarias heterocíclicas tales como N-metilmorfolina y piridina; y similares. La cantidad de la base a usar normalmente es de aproximadamente 1 a 2 veces tanto como los moles totales de la unidad peptídica.

El ácido dicarboxílico que constituye el colágeno modificado con retinol de la presente invención no está limitado en particular siempre y cuando incluya ácido succínico o un anhídrido del mismo. Los ejemplos incluyen ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adipico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido sebáico, ácido ftálico, ácido isoftálico, ácido tereftálico, ácido fumárico y ácido maleico, y que anhídridos de los mismos. Son preferentes ácido malónico, ácido succínico y ácido glutárico, y anhídridos de los mismos, y son más preferentes el ácido succínico y un anhídrido del mismo.

El colágeno modificado con retinol de la presente invención incluye no solamente colágeno en el que los ácidos dicarboxílicos como se ha descrito anteriormente se unen a un grupo hidroxilo del colágeno, sino también colágeno en el que dos o más tipos de los ácidos dicarboxílicos se unen a cada uno de los diferentes grupos hidroxilo del colágeno, respectivamente.

En el colágeno modificado con retinol de la presente invención, uno de los dos grupos carboxilo del ácido succínico se esterifica con un grupo hidroxilo del colágeno.

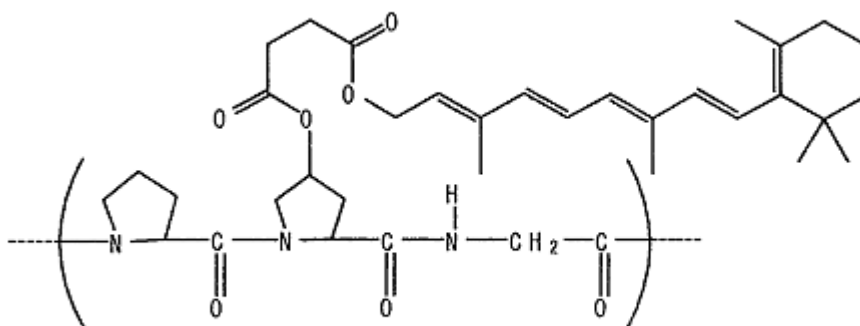
Además, el colágeno modificado con retinol de la presente invención incluye colágeno en el que el ácido succínico está unido a uno de los grupos hidroxilo del colágeno en el que un ácido dicarboxílico está unido a todos los grupos hidroxilo.

El retinol que constituye el colágeno modificado con retinol de la presente invención es, como se ha descrito anteriormente, retinol en el que retinol se esterifica a través de un grupo hidroxilo con otro grupo carboxilo de un ácido succínico que se esterifica con colágeno.

- 5 El colágeno modificado con retinol de la presente invención incluye colágeno en el que el retinol está unido a un ácido dicarboxílico del ácido succínico unido al colágeno en el que el retinol está unido a todos los ácidos dicarboxílicos.

- 10 El colágeno modificado con retinol de la presente invención incluye colágeno modificado con retinol que comprende una unidad peptídica representada por la fórmula (2):

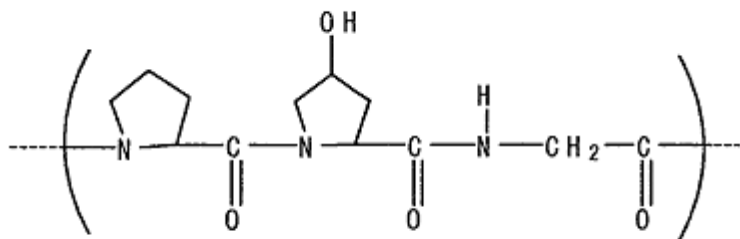
[Fórmula Química 4]



(2)

- 15 en una realización preferente, el colágeno modificado con retinol de la presente invención incluye colágeno modificado con retinol que comprende la unidad peptídica representada por la fórmula (2) y al menos un tipo de una unidad peptídica representada por la fórmula (3):

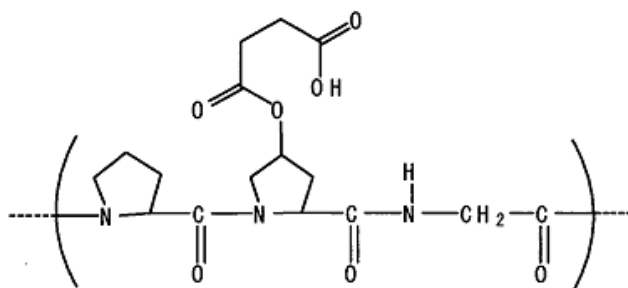
[Fórmula Química 5]



(3)

y una unidad peptídica representada por la fórmula (4):

[Fórmula Química 6]



(4).

Una proporción del contenido entre la unidad peptídica representada por la fórmula (2), y al menos un tipo o de una unidad peptídica de la unidad peptídica representada por la fórmula (3) y la unidad peptídica representada por la fórmula (4), cada una constituyendo el colágeno modificado con retinol de la presente invención, es decir, (2) : (3), (2) : (4) o (2) : ((3) + (4)) está, en términos de proporción molar, en el intervalo de aproximadamente 0,1 : 99,9 a aproximadamente 100 : 0, de aproximadamente 0,3 : 99,7 a aproximadamente 100 : 0, de aproximadamente 0,5 : 99,5 a aproximadamente 100 : 0, de aproximadamente 1,0 : 99,0 a aproximadamente 100 : 0, de aproximadamente 3,0 : 97,0 a aproximadamente 100 : 0, de aproximadamente 0,1 : 99,9 a aproximadamente 99,9 : 0,1, de aproximadamente 0,3 : 99,7 a aproximadamente 99,9 : 0,1, de aproximadamente 0,5 : 99,5 a aproximadamente 99,9 : 0,1, de aproximadamente 1,0 : 99,0 a aproximadamente 99,9 : 0,1, de aproximadamente 3,0 : 97,0 a aproximadamente 99,9 : 0,1, de aproximadamente 0,1 : 99,9 a aproximadamente 99,7 : 0,3, de aproximadamente 0,3 : 99,7 a aproximadamente 99,7 : 0,3, de aproximadamente 0,5 : 99,5 a aproximadamente 99,7 : 0,3, de aproximadamente 1,0 : 99,0 a aproximadamente 99,7 : 0,3, de aproximadamente 3,0 : 97,0 a aproximadamente 99,7 : 0,3, de aproximadamente 0,1 : 99,9 a aproximadamente 99,5 : 0,5, de aproximadamente 0,3 : 99,7 a aproximadamente 99,5 : 0,5, de aproximadamente 0,5 : 99,5 a aproximadamente 99,5 : 0,5, de aproximadamente 1,0 : 99,0 a aproximadamente 99,5 : 0,5, de aproximadamente 3,0 : 97,0 a aproximadamente 99,5 : 0,5, de aproximadamente 0,1 : 99,9 a aproximadamente 99,0 : 1,0, de aproximadamente 0,3 : 99,7 a aproximadamente 99,0 : 1,0, de aproximadamente 0,5 : 99,5 a aproximadamente 99,0 : 1,0, de aproximadamente 1,0 : 99,0 a aproximadamente 99,0 : 1,0, de aproximadamente 3,0 : 97,0 a aproximadamente 99,0 : 1,0, de aproximadamente 0,1 : 99,9 a aproximadamente 97,0 : 3,0, de aproximadamente 0,3 : 99,7 a aproximadamente 97,0 : 3,0, de aproximadamente 0,5 : 99,5 a aproximadamente 97,0 : 3,0, de aproximadamente 1,0 : 99,0 a aproximadamente 97,0 : 3,0 y de aproximadamente 3,0 : 97,0 a aproximadamente 97,0 : 3,0; preferentemente de aproximadamente 0,1 : 99,9 a aproximadamente 100 : 0, de aproximadamente 0,3 : 99,7 a aproximadamente 100 : 0, de aproximadamente 0,5 : 99,5 a aproximadamente 100 : 0, de aproximadamente 1,0 : 99,0 a aproximadamente 100 : 0 y de aproximadamente 3,0 : 97,0 a aproximadamente 100 : 0; más preferentemente de aproximadamente 0,5 : 99,5 a aproximadamente 100 : 0, de aproximadamente 1,0 : 99,0 a aproximadamente 100 : 0 y de aproximadamente 3,0 : 97,0 a aproximadamente 100 : 0; y lo más preferentemente de aproximadamente 1,0 : 99,0 a aproximadamente 100 : 0.

Cuando la proporción del contenido de unidad peptídica (2) con respecto a la unidad peptídica (3), (4) o a las unidades peptídicas (3) + (4), en términos de proporción molar, es inferior a aproximadamente 0,1 : 99,9, no se producirá un efecto excelente de prevención de la formación de arrugas, un efecto excelente de mejora de las arrugas, un efecto excelente de hacer que la piel sea bonita y un efecto excelente de mejorar la calidad de la piel, y por lo tanto no es preferente.

El colágeno modificado con retinol de la presente invención tiene un pico de peso molecular en el intervalo de, como un peso molecular, de aproximadamente 500 a aproximadamente 3.000.000, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 3.000.000, de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 3.000.000, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 3.000.000, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 3.000.000, de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 3.000.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.000.000, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 2.000.000, de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 2.000.000, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 2.000.000, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 2.000.000, de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 2.000.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.000.000, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.000.000, de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 1.000.000, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 1.000.000, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.000.000, de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 1.000.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 700.000, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 700.000, de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 700.000, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 700.000, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 700.000, de aproximadamente 30.000 a

aproximadamente 700.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 500.000, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 500.000, de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 500.000, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 500.000, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 500.000, de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 500.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 100.000, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 100.000, de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 100.000, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 100.000, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000 y de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 100.000; preferentemente tiene un pico de peso molecular en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 3.000.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.000.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.000.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 700.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 500.000 y de aproximadamente 500 a aproximadamente 100.000; y lo más preferentemente tiene un pico de peso molecular en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.000.000.

El peso molecular del colágeno modificado con retinol de la presente invención se puede medir, por ejemplo, mediante cromatografía de permeación en gel.

El colágeno modificado con retinol de la presente invención tiene preferentemente una absorción en el espectro de infrarrojos de aproximadamente 1700 a 1800 cm^{-1} obtenida a partir del enlace de éster de ácido dicarboxílico, una absorción de UV de aproximadamente 300 a 350 nm obtenida a partir del retinol, un pico cerca de aproximadamente 1 a 2 ppm en RMN ^1H obtenido a partir de la estructura cíclica del retinol, y un pico cerca de aproximadamente 5,5 a 7 ppm obtenido a partir de la estructura de polieno del retinol. Cuando el pico de absorción en el espectro de infrarrojos o el pico de absorción de UV en los intervalos es pequeño, la cantidad de un ácido dicarboxílico unido a la cadena principal de colágeno, o la cantidad de retinol unido al ácido dicarboxílico es pequeño. La absorción en el espectro de infrarrojos se puede medir por FT-IR (método de KBr).

La cantidad del ácido dicarboxílico a unir en el colágeno modificado con retinol de la presente invención se puede medir, por ejemplo, mediante la proporción de fuerza del pico entre un éster y una amida en la absorción en el espectro de infrarrojos. Se puede medir con más detalle mediante la cuantificación de la cantidad (número de moles) de ácido dicarboxílico sin reaccionar con HPLC después de una reacción de adición del ácido dicarboxílico. Es decir, la cantidad obtenida mediante la resta de la cantidad de ácido dicarboxílico sin reaccionar de toda la cantidad del ácido dicarboxílico usada en la síntesis es la cantidad del ácido dicarboxílico a unir.

La cantidad de retinol la unión en el colágeno modificado con retinol de la presente invención se puede medir, por ejemplo, cuantificando la cantidad (número de moles) de retinol sin reaccionar con HPLC después de la reacción de adición del retinol. Es decir, la cantidad obtenida mediante la resta de la cantidad de retinol sin reaccionar de la cantidad total del retinol usada en la síntesis es la cantidad del retinol a unir.

El colágeno modificado con retinol de la presente invención tiene una compatibilidad elevada con la piel, y se adsorbe a firmemente y permea la piel cuando se aplica a la piel, mejora de forma sostenible la expresión de los genes enzimáticos de la ruta de síntesis del ácido hialurónico y aumenta la producción de ácido hialurónico, y al provocar la síntesis de colágeno, se ejerce de forma sostenible y acumulativa un efecto excelente y de múltiples fases de prevenir la formación de arrugas, un efecto excelente y de múltiples fases de mejorar las arrugas, un efecto excelente y de múltiples fases de hacer que la piel sea bonita y un efecto excelente y de múltiples fases de mejorar la calidad de la piel.

Por consiguiente, el colágeno modificado con retinol de la presente invención puede ser útil como un agente para prevenir la formación de arrugas, un agente para mejorar las arrugas, un agente para hacer que la piel sea bonita, un agente para mejorar la calidad de la piel, una gente para estimular producción de ácido hialurónico, una gente para activar la ácido hialurónico sintasa y un agente para estimular la producción de colágeno.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir el colágeno modificado con retinol como se ha descrito anteriormente.

El método para producir el colágeno modificado con retinol de la presente invención comprende:

- (1) preparar colágeno conjugado con ácido dicarboxílico mediante unión de ácido succínico o su anhídrido a un grupo hidroxilo del colágeno; y a continuación
- (2) esterificar el grupo(s) hidroxilo del retinol con un grupo carboxilo del ácido succínico del colágeno conjugado con ácido dicarboxílico.

El método para producir el colágeno modificado con retinol de la presente invención usa el colágeno, el ácido succínico o su anhídrido, y el retinol como se describe en el colágeno modificado con retinol.

La unión del ácido dicarboxílico por su anhídrido al colágeno se puede realizar mediante un método conocido públicamente por sí mismo usando el disolvente, el agente de condensación de deshidratación y el adyuvante de condensación como se describe en el colágeno sintético.

Una reacción de adición a colágeno conjugado con ácido dicarboxílico normalmente se realiza bajo la condición de añadir una cantidad de 1 o 2 equivalentes de DIPEA basándose en un mol de la unidad peptídica con respecto a DMF (dimetilformamida) o similares. A continuación, se realizó una reacción para unir el retinol al colágeno conjugado con ácido dicarboxílico en la condición que se ha descrito anteriormente; sin embargo, se encontró que la adición de retinol a esto apenas se producía. De forma sorprendente, cuando se usaba una amina terciaria como un disolvente en la etapa de unión del retinol a un grupo ácido dicarboxílico, se encontró que la cantidad de retinol para su adición aumentaba. Algunos ejemplos de la amina terciaria incluyen preferentemente trialkilaminas, y más preferentemente diisopropiletilamina.

El colágeno modificado con retinol de la presente invención tiene una compatibilidad excelente con la piel en comparación con el retinol o sus derivados convencionales, y puede actuar en la piel de una manera sostenida para ejercer de forma continua un efecto excelente y de múltiples fases de prevenir la formación de arrugas, un efecto excelente y de múltiples fases de mejorar las arrugas, un efecto excelente y de múltiples fases de hacer que la piel sea bonita y en efecto excelente y de múltiples fases de mejorar la calidad de la piel.

Por consiguiente, la presente invención proporciona, en un aspecto adicional, una composición externa para la piel y un cosmético en forma de lámina cada uno conteniendo el colágeno modificado con retinol como un principio activo.

La cantidad del colágeno modificado con retinol a incorporar en la composición externa para la piel de la presente invención es de aproximadamente 1×10^{-6} a un 50 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-5} a un 50 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-4} a un 50 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-4} a un 50 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-3} a un 50 % en peso, de aproximadamente 0,001 a un 50 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-6} a un 40 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-5} a un 40 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-4} a un 40 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-4} a un 40 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-3} a un 40 % en peso, de aproximadamente 0,001 to 40 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-6} a un 30 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-5} a un 30 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-4} a un 30 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-4} a un 30 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-3} a un 30 % en peso, de aproximadamente 0,001 a 30 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-6} a un 20 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-5} a un 20 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-4} a un 20 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-4} a un 20 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-3} a un 20 % en peso, de aproximadamente 0,001 a un 20 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-6} a un 10 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-5} a un 10 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-4} a un 10 % en peso, de aproximadamente 1×10^{-4} a un 10 % en peso, de aproximadamente 5×10^{-3} a un 10 % en peso o de aproximadamente un 0,001 a un 10 % en peso, y preferentemente de aproximadamente un 1×10^{-5} a un 30 % en peso, basándose en la cantidad total de las composiciones impregnadas en la composición externa para la piel. Cuando la candidata a incorporar es inferior a aproximadamente un 1×10^{-6} % en peso, los efectos pretendidos de la presente invención pueden no producirse la manera suficiente, y por otro lado, cuando se añade una cantidad de más de un 50 % en peso, no se pueden obtener mejoras en los efectos que corresponden al incremento.

La composición externa para la piel de la presente invención se puede formular en agentes farmacéuticos tales como pomadas y cremas, cosméticos básicos tales como limpiadores, emulsiones, cremas, lociones, geles y cosméticos líquidos faciales, y cosméticos de maquillaje tales como bases y pintalabios. El cosmético en forma de lámina de la presente invención puede estar formado por el colágeno modificado con retinol solo, o puede estar formado por otros ingredientes arbitrarios que se pueden incorporar de forma apropiada además del colágeno modificado con retinol. Se puede formular en mascarillas, máscaras faciales y similares.

La formulación de la composición externa para la piel o el cosmético con forma de lámina, cada uno conteniendo el colágeno modificado con retinol como un principio activo, se puede realizar mediante la incorporación de un disolvente, un tensioactivo, un agente oleoso, un material de perfume, un pigmento, un agente antioxidación, un conservante, un colorante y similares que se conocen bien en la técnica de acuerdo con un método bien conocido por sí mismo.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora con más detalle a modo de ejemplos; sin embargo, los ejemplos se proporcionan con el fin de ilustración, y no pretenden limitar la invención a los ejemplos. Se debería indicar que "%" representa "% en peso" a menos que se indique de otro modo.

Ejemplo de Preparación

Síntesis de colágeno modificado con retinol

(1) Reacción de síntesis de poli (Pro-Hip-Gli)

Después de disolver el tripéptido Pro-Hip-Gli (PHG) (PEPTIDE INSTITUTE INC.) en una solución de tampón fosfato 10 mM (pH de 7,4) y agitar la solución, se añadió 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) a la solución, y la solución resultante se agitó y se enfrió a 5 °C o inferior. A continuación, se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)

carbodiimida a la solución resultante y se dejó en reposo (reacción) durante 90 minutos seguido de calentamiento hasta 20 °C. La reacción se terminó a continuación mediante la adición de una solución salina tamponada con fosfato 10 mM (PBS; pH 7,4, que contiene NaCl 0,15 M) a la solución resultante. Después de dializar la solución de reacción, el reactivo se liofilizó para obtener colágeno sintético similar a una esponja.

5

(2) Evaluación de la sustancia de la síntesis de poli (Pro-Hip-Gli)

El peso molecular del colágeno sintetizado (poli-PHG) preparado de este modo se midió mediante cromatografía de permeación en gel (GE Healthcare Japan Corporation, sistema purificador AKTA, columna: Superdex 200HRGL, caudal: 0,5 ml/minuto, eluyente: solución salina tamponada, fosfato 10 mM (PBS; pH 7,4, que contiene NaCl 0,15 M)). Como resultado, se confirmó que el peso molecular del colágeno sintéticos se distribuía en el intervalo de 2.000 a 100.000 y la parte superior del pico era cercana a 20.000. El peso molecular se calculó usando polietilenglicol (Fluka) como un material de referencia.

Además, se midió el espectro del dicroísmo circular del colágeno sintético obtenido de este modo, y se observó un efecto Cotton positivo a 225 nm y con efecto Cotton negativo a 197 nm. También se confirmó que se había formado una estructura de triple hélice.

(3) Reacción de adición de ácido succínico a colágeno sintético (poli-PHG)

El colágeno sintético seco se cortó en piezas pequeñas, y las piezas se lavaron con dimetilformamida (DMF). Se añadió DMF y la solución resultante se enfrió a 5 °C o inferior a la vez que se agitaba la solución. Después de añadir anhídrido succínico (reactivo de calidad especial, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) purificado por recristalización en iso-propanol y diisopropiletilamina (DIPEA), se permitió que la solución reaccionara durante 2 horas. A continuación, la temperatura de la solución resultante se mantuvo a 20 °C y se permitió que la solución resultante reaccionara durante otra noche. La reacción terminó por dilución de la solución con agua hasta 4 veces su volumen original. Después de dializar la solución de reacción, el reactante se liofilizó para obtener colágeno sintético similar a una esponja con adición de ácido succínico a este.

(4) Evaluación del colágeno sintético conjugado con ácido succínico

Un espectro de absorción de infrarrojos del colágeno sintético conjugado con ácido succínico preparado de este modo se midió por FT-IR (método KBr). Como resultado, una absorción obtenida a partir de un enlace éster apareció cerca de 1730 cm^{-1} , y se confirmó que el colágeno sintético conjugado con ácido succínico obtenido de este modo tenía una estructura en la que el ácido succínico se esterificaba con grupo(s) hidroxilo del colágeno sintético.

(5) Reacción de adición de retinol a colágeno sintético conjugado con ácido succínico

Se añadió dimetilformamida al colágeno sintético conjugado con ácido succínico hasta suspensión. A continuación, se añadieron N-hidroxisuccinimida (HOSu) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida a la solución resultante y la solución se agitó, y se permitió que reaccionara a 20 °C durante una noche. Después de lavar el reactante con metanol y tetrahidrofuran, se añadió diisopropiletilamina (DIPEA) como es disolvente de reacción. A continuación, se añadió retinol a la solución resultante y se permitió que reaccionara a la vez que se agitaba la solución a 20 °C durante una noche. Después de lavar con isopropanol y benceno, el reactante se liofilizó para obtener colágeno modificado con retinol de interés.

(6) Evaluación del colágeno modificado con retinol

El reactante obtenido de este modo se disolvió en un disolvente deuterado, y el espectro de RMN ^1H del mismo se midió (JEOL, espectrómetro JNM-ECP 600). Como resultado, se confirmaron un pico obtenido a partir de la estructura cíclica del retinol de 1 a 2 ppm, y un pico obtenido a partir de la estructura de polieno del retinol de 5,5 a 7 ppm. Además, un pico de hidrógeno obtenido a partir del C15 del retinol se desplazó al lado del campo magnético inferior en comparación con el de un retinol libre. Por consiguiente, se confirmó que el reactante obtenido de este modo tenía una estructura de adición de retinol al colágeno sintético conjugado con ácido succínico a través de un enlace éster.

Además, se observó la absorción de UV del reactante obtenido de este modo a 325 nm obtenido a partir de retinol, y se confirmó la adición de retinol.

60

Ejemplo Experimental 1

Evaluación del efecto afectado en la expresión de genes de la ácido hialurónico sintasa

Evaluación de colágeno modificado con retinol usando el sistema de cultivo de monocapa de queratinocitos 1 (Comparaciones con retinol y derivados de retinol)

Se sembraron queratinocitos epidérmicos humanos (Cell Application Inc.) en una placa de 24 pocillos que contenía un medio de crecimiento de queratinocitos epidérmicos humanos (Cell Application Inc.) de modo que el número de células contenidas en un pocillo era de $1,5 \times 10^5$, y se cultivaron en la condición de CO₂ al 5 %-aire al 95 % y a 37 °C durante aproximadamente dos días hasta que las células alcanzaron la confluencia.

A continuación, el medio se descartó, y se añadió un medio preparado para tener una concentración final de retinol de 10^{-6} M o 10^{-5} M, y que contenía el colágeno modificado con retinol (REcol) en el ejemplo de preparación, retinol (Retinol), éster de retinol del ácido palmítico (PalRE) o éster de retinol del ácido acético (AceRE), o un medio solo (control, V) y se cultivó en la condición de CO₂ al 5 %-aire al 95 % y a 37 °C durante 6, 24 o 48 horas. Al mismo tiempo, cada sustancia sometida a ensayo se disolvió en una pequeña cantidad de dimetilformamida y se añadió al medio, y la concentración de la dimetilformamida en todos experimentos se ajustó a un 0,1 % en peso.

Después de cultivar durante un periodo de tiempo dado, los queratinocitos se recuperaron y el ARN se extrajo de los mismos. A continuación, la expresión genética de las ácido hialurónico sintasas HAS2 y HAS3 se evaluó mediante PCR en tiempo real usando los siguientes pares de cebadores (Takara Bio Inc.):

HAS2:

Cebador Directo agtcattgtacacagccttcagagca (SEQ. ID. No: 1)
Cebador Inverso cacctcaacctggggtcttc (SEQ. ID. No: 2)

HAS3:

Cebador Directo tcggcgattcggtggacta (SEQ. ID. No: 3)
Cebador Inverso cctccaggactcgaagcatctc (SEQ. ID. No: 4).

Los resultados se muestran en la Fig. 1.

El gráfico muestra las proporciones de las expresiones genéticas de cada sustancia sometida a ensayo cuando la proporción de expresión HAS2 o HAS3 con respecto a los genes de la peptidilprolisomerasa A (PPIA) en el control (V) después de 6 horas de cultivo se establece en 1.

Como resultado, se encontró que el colágeno modificado con retinol prolongaba las expresiones elevadas los genes tanto de HAS2 como de HAS3 durante 48 horas o más después del cultivo. Además, se encontró que el nivel de expresión genética dependía de la concentración del colágeno modificado con retinol. Por otro lado, se encontró que el éster de retinol del ácido acético y el éster de retinol del ácido palmítico, ambos eran derivados del retinol convencionales, eran capaces de inducir niveles menores de expresión genética en comparación con el colágeno modificado con retinol.

Ejemplo Experimental 2

Evaluación del efecto afectado en la expresión de genes de la ácido hialurónico sintasa

Evaluación del colágeno modificado con retinol usando el sistema de cultivo de monocapa de queratinocitos 1 (Comparaciones con el sistema de retinol y mezcla de retinol)

Las expresiones de los genes HAS2 y HAS3 de la ácido hialurónico sintasa genes se evaluaron de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 1 usando un medio preparado para tener una concentración final de retinol de 10^{-5} M, y que contiene el colágeno modificado con retinol (REcol) en el ejemplo de preparación, una mezcla (una MEZCLA, no conjugada) de retinol y el colágeno sintético conjugado con ácido succínico en el ejemplo de preparación, y retinol (Retinol). Los resultados se muestran en la Fig. 2.

Como resultado, se encontró que el colágeno modificado con retinol inducía de forma notable expresiones más elevadas de los genes tanto HAS2 como HAS3 después de 48 horas de cultivo en comparación con la mezcla de retinol y el colágeno sintético conjugado con ácido succínico, y retinol.

Ejemplo Experimental 3

Evaluación de la toxicidad celular del colágeno modificado con retinol

Las tasas de supervivencia celular de los queratinocitos frente al colágeno modificado con retinol se evaluaron, y se compararon con las de los casos en los que se usaron retinol (Sigma Aldrich), una mezcla de retinol y colágeno sintético, y éster de retinol del ácido acético (Sigma Aldrich) que es un derivado de retinol de finalidad general, respectivamente.

Se sembraron queratinocitos epidérmicos humanos (Cell Application Inc.) en una placa de 96 pocillos que contenía un medio de crecimiento de queratinocitos epidérmicos humanos (Cell Applications Inc.) de modo que el número de células contenidas en un pocillo era de $2,32 \times 10^4$, y se cultivaron en la condición de CO₂ al 5 %-aire al 95 % y a 37 °C durante aproximadamente dos días hasta que las células alcanzaron la confluencia.

Por otro lado, cada una de las sustancias sometidas a ensayo (retinol (Retinol), colágeno modificado con retinol (REcol), éster de retinol del ácido acético (AceRE), y mezcla de retinol y colágeno sintético (Retinol + pPHG)) se disolvió en una pequeña cantidad de dimetilsulfóxido (DMSO), y el medio se diluyó con KBM de modo que la concentración de retinol llegó a ser de 5 a 200 µM (o se preparó de modo que la concentración final de DMSO del medio fuera de un 1 %, o se diluyó con KBM de modo que la concentración final de DMSO del medio fuera de un 1 % en el área de control). A continuación, este medio sustituyó al medio que se usó para cultivar los queratinocitos epidérmicos humanos.

Las tasas de supervivencia de los queratinocitos epidérmicos humanos 24 horas después de intercambiar el medio se evaluaron con un reactivo de crecimiento celular, WST-1 (Roche Diagnostics) (N = 5). Los resultados se muestran en la Fig. 3.

Como resultado, se mostró que las tasas de supervivencia de las células eran más elevadas cuando el colágeno modificado con retinol se usó en comparación con aquellas del caso en el que se usaba retinol o la mezcla de retinol y colágeno, y que las tasas de supervivencia celular eran las mismas o superiores que las de el caso en el que se usaba el éster de retinol del ácido acético. Por consiguiente, se encontró que la citotoxicidad del colágeno modificado con retinol era tan baja como la de un derivado de retinol de finalidad general.

Ejemplo Experimental 4

Evaluación de producción de citoquina inflamatoria de colágeno modificado con retinol usando sistema de cultivo de monocapa de queratinocitos

Se evaluó la cantidad de producción de la citoquina IL-8 inflamatoria que es el índice bético causado por el colágeno modificado con retinol en el sistema de cultivo de monocapa de queratinocitos.

Se sembraron queratinocitos epidérmicos humanos (HEK) en una placa de 24 pocillos que contenía un medio de crecimiento de queratinocitos epidérmicos humanos ($1,0 \times 10^5$ células/pocillo) cultivaron durante dos días para que las células alcanzaran la confluencia.

Por otro lado, cada una de las sustancias sometidas a ensayo (retinol (Retinol), colágeno modificado con retinol (REcol), y colágeno conjugado con ácido succínico (Suc)) se disolvió en una pequeña cantidad de DMSO, y el medio se diluyó con KBM de modo que la concentración de retinol llegó a ser de 10^{-6} M o 10^{-5} M (o se preparó de modo que la concentración final de DMSO del medio fuera de un 1 %, o se diluyó con KBM de modo que la concentración final de DMSO del medio fuera de un 1 % en el control). A continuación, este medio sustituyó al medio que se usó para cultivar los queratinocitos epidérmicos humanos.

El medio de cultivo se recuperó 24 horas después de intercambiar el medio, y la cantidad de producción de IL-8 se cuantificó con un kit de ELISA (R&D Systems) (N = 4). Los resultados se muestran en la Fig. 4.

Como resultado, se mostró que la producción de la citoquina IL-8 inflamatoria que se considera que es un índice de trastorno inflamatorio de la epidermis se suprimía cuando se aplicaba el colágeno modificado con retinol en comparación con el caso en el que se usaba retinol o colágeno conjugado con ácido succínico, y que el colágeno modificado con retinol se podría aplicar a la piel sin causar picores y similares que surgen como un efecto secundario por el uso de retinol.

Ejemplo Experimental 5

Evaluación de la producción de citoquina inflamatoria de colágeno modificado con retinol usando epidermis cultivada tridimensional humana

Se evaluó la cantidad de producción de citoquinas IL-8 inflamatoria que es el índice de picor causado por el colágeno modificado con retinol en el sistema de epidermis cultivada tridimensional de queratinocitos.

Un ml de un medio de ensayo de acompañamiento se añadió a una microplaca de 12 pocillos, y la epidermis cultivada tridimensional humana (Modelo de LabCyte EPI, J-TEC, LTD.) se cultivó con antelación en la condición de CO₂ al 5 %-aire al 95 % y a 37 °C durante dos horas.

A continuación, se añadieron 80 µl de aceite de oliva (Control), retinol (Retinol) preparado para tener una concentración de retinol de un 0,1 %, o el colágeno modificado con retinol (REcol) a la epidermis cultivada que se había cultivado con antelación, y la epidermis se cultivó durante cuatro días. El aceite de oliva se usó para preparar

el retinol y la solución de colágeno modificado con retinol.

El medio se recuperó al segundo y cuarto días después de la adición, y la cantidad de producción de IL-8 se cuantificó con el kit de ELISA (R&D Systems) (N = 5 hasta el segundo día, y N = 3 hasta el cuarto día). La diferencia significativa se analizó con el ensayo t de Student. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

Como resultado, se mostró que la producción de citoquina IL-8 inflamatoria, que se considera que es un índice para trastorno inflamatorio de la epidermis se suprimía cuando el colágeno modificado con retinol se aplicaba en comparación con el caso en el que se usaba el retinol con la misma concentración, y que el colágeno modificado con retinol se podía aplicar a la piel sin causar picores y similares que surgen como un efecto secundario por el uso de retinol.

Al mismo tiempo, la cantidad de producción de IL-8 causada por el colágeno modificado con retinol en el Ejemplo Experimental 4 estaba suprimida de forma más elevada que la del área de control, y también la tendencia presentada en el Ejemplo Experimental 4 era diferente del resultado del Ejemplo Experimental 5. Se considera que la razón para esto surge del hecho de que en el caso en el que se usaba un sistema de piel cultivada tridimensional (Ejemplo Experimental 5), se añadía una sustancia en el estrato córneo de modo que el área en la que la sustancia se ponía en contacto directamente con las células vivas era pequeña, mientras que en el caso en el que se usaba el sistema de cultivo de monocapa (Ejemplo Experimental 4), las células vivas se ponían en contacto directamente con la sustancia de modo que el efecto producido por la sustancia aparecía de forma significativa.

Ejemplo Experimental 6

Evaluación de la producción de ácido hialurónico con colágeno modificado con retinol usando epidermis cultivada tridimensional humana

En el Ejemplo Experimental 1 y en el Ejemplo Experimental 2, se mostró que el colágeno modificado con retinol inducía la expresión de genes de la ácido hialurónico sintasa mediante una evaluación de PCR en tiempo real de queratinocitos. Por lo tanto, como condiciones más cercanas a la piel usadas en la práctica real, la producción de ácido hialurónico por sí mismo se cuantificó con epidermis cultivada tridimensional humana (LabCyte, Modelo 12 de EPI).

Un ml de un medio de ensayo de acompañamiento se añadió a una microplaca de 12 pocillos, y la epidermis cultivada tridimensional humana (Modelo de LabCyte EPI, J-TEC, LTD.) se cultivó con antelación en la condición de CO₂ al 5 %-aire al 95 % y a 37 °C durante dos horas.

A continuación, se añadieron 80 µl de aceite de oliva (Control), retinol (Retinol) preparado para tener una concentración de retinol de un 0,1 %, o el colágeno modificado con retinol (REcol) a la epidermis cultivada que se había cultivado con antelación, y la epidermis se cultivó durante cuatro días. El aceite de oliva se usó para preparar el retinol y la solución de colágeno modificado con retinol.

El medio de epidermis cultivada se recuperó al segundo y cuarto días después de la adición, y la cantidad de producción de ácido hialurónico en la epidermis cultivada se cuantificó con un kit de medición de ácido hialurónico (SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION) (N = 5 hasta el segundo día, y N = 3 hasta el cuarto día). La diferencia significativa se analizó con el ensayo t de Student. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

Como resultado, se mostró que el colágeno modificado con retinol presentaba una cantidad de producción equivalente de ácido hialurónico a la del retinol el segundo día, y presentaba una cantidad de producción más elevada de ácido hialurónico que la de retinol el cuarto día.

Ejemplo Experimental 7

Evaluación de la síntesis de colágeno de tipo 1 con colágeno modificado con retinol usando piel cultivada tridimensional humana

Como condiciones más cercanas a las de la piel usada en la práctica real, la cantidad de síntesis de colágeno de tipo 1 se cuantificó con piel cultivada tridimensional humana (EFT-412, KURABO INDUSTRIES, LTD.).

Dos ml de un medio de ensayo de acompañamiento se añadieron a una placa de 6 pocillos, y la piel cultivada tridimensional humana (EFT-412, KURABO INDUSTRIES, LTD.) se cultivó con antelación en una incubadora con una atmósfera de un 5 % de CO₂ y a 37 °C durante una noche.

A continuación, se añadieron 80 µl de aceite de oliva, un 0,5 % de retinol o un 0,5 % de colágeno modificado con retinol a la piel cultivada que se había cultivado con antelación, y la piel cultivada se cultivó durante dos días. El aceite de oliva se usó para preparar el retinol y la solución de colágeno modificado con retinol.

El medio cultivado se recuperó el primer y segundo días después de la adición, y la cantidad de procolágeno de tipo I (PIP) en el medio se cuantificó con un kit de EIA de PIP (Takara Bio Inc.) (N = 6 hasta el segundo día). La diferencia significativa se analizó con el ensayo t de Student. Los resultados se muestran en la Fig. 7.

- 5 Como resultado, el colágeno modificado con retinol presentaba una cantidad de síntesis de PIP más elevada que la del retinol, y se confirmó que el colágeno modificado con retinol presentaba un efecto de estimulación elevada de la síntesis de colágeno de tipo 1.

- 10 Al mismo tiempo, el colágeno modificado con retinol de la presente invención se adsorbe firmemente a la piel cuando se aplica a la misma y permea la piel con respecto al estrato córneo en un periodo de tiempo relativamente corto, y de este modo una cierta cantidad del colágeno modificado con retinol permanece en la piel incluso cuando la piel se lava y su efecto se ejerce de forma sostenida y acumulativa.

- 15 Basándose en estos experimentos, se encontró que el colágeno modificado con retinol de la presente invención prolonga la expresión elevada de genes de la ácido hialurónico sintasa, y tiene una toxicidad celular baja, supresión de producción de citoquinas inflamatorias, y efectos de producción elevada de ácido hialurónico y colágeno durante un periodo de tiempo prolongado en comparación con el retinol o un derivado de retinol convencional. Se mostró que el colágeno modificado con retinol de la presente invención, cuando se aplica a la piel, ejerce un efecto excelente de prevención de la formación de arrugas, un efecto excelente de mejora de las arrugas, un efecto excelente de hacer
20 que la piel sea bonita y un efecto excelente de mejorar la calidad de la piel.

- Como se ha mencionado anteriormente, se mostró que el colágeno modificado con retinol de la presente invención tiene un efecto, para las células de piel humanas, de aumentar las cantidades de producción de ácido hialurónico y producción de colágeno de tipo 1.

- 25 El ácido hialurónico presenta un efecto de hidratación de la epidermis debido a su capacidad de albergar agua, y efecto de mejora de las arrugas finas formadas por la sequedad de la piel y evitar que se formen las arrugas finas mediante la hidratación de la epidermis. Además, se informa que el ácido hialurónico en el estrato córneo actúa como un neutralizador de radicales (Fragrance Journal, 2004, 5, pp. 65-71), y de este modo el colágeno modificado
30 con retinol de la presente invención tiene un efecto de hidratación, un efecto de crecimiento celular (efecto de provocar la renovación), y efecto antioxidación. Además, durante el transcurso de la curación de heridas, la cantidad de ácido hialurónico en la dermis aumenta y el ácido hialurónico estimula la migración y crecimiento de células, suministro de nutrientes y enzimas y similares (Fragrance Journal, 2004, 5, pp. 65-71), y de este modo el colágeno modificado con retinol de la presente invención tiene un efecto de curación de heridas en la epidermis. Se informa
35 que el ácido hialurónico en el estrato córneo interactúa con una estructura lamelar lipídica intercelular (The Journal of Investigative Dermatology, 2000, Vol. 114, n.º 6, pp. 1184-1187). Se considera que, cuando el ácido hialurónico se añade a la piel cultivada, la epidermis se hace gruesa y el ácido hialurónico estimula funciones de barrera producidas por el lípido de la epidermis (Experimental Dermatology, 19, e336-e339). Por lo tanto, el colágeno modificado con retinol de la presente invención tiene un efecto de estimular las funciones de barrera de la epidermis.

- 40 Además, cuando aumenta el colágeno de la dermis, se produce un efecto de mejora de la elasticidad de la piel atribuido a la estructura de la dermis. Por lo tanto, el colágeno modificado con retinol de la presente invención tiene un efecto de prevención/mejora en la flacidez de la piel, y además tiene un efecto de prevención de la formación de arrugas y un efecto de mejora de las arrugas tanto de arrugas profundas en la dermis como de arrugas poco profundas en la epidermis.

- Además, el colágeno modificado con retinol de la presente invención tiene un efecto de mejora de la resistencia de la piel, un efecto de mejora del fotoenvejecimiento cutáneo, un efecto de antienvjecimiento, y otras eficaces presentadas por cosméticos tales como acondicionamiento de la piel, acondicionamiento de la textura de la piel,
50 manteniendo la piel sana, prevención de la aspereza cutánea, hidratación de la piel, manteniendo la flexibilidad de la piel, firmeza de la piel, prevención de la sequedad de la piel, suavizado de la piel, transmisión de resistencia a la piel, transmisión de brillo a la piel, alisado de la piel y protección de la piel.

Ejemplo de Formulación 1: Loción Cutánea

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	0,1
Etanol	5,0
Glicerina	4,0
Trehalosa	1,0
Fenoxietanol	0,7
Aceite de Ricino Hidrogenado con PEG-60	0,3

Ingredientes	Contenido (%)
Hialuronato Sódico	0,1
Parabeno	0,1
Ácido Cítrico	0,08
Citrato Sódico	0,08
Fragancia	0,03
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 2: Serum

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	5,0
Etanol	10,0
Glicerina	10,0
1,3-Butilenglicol	6,0
Fenoxietanol	0,8
Carboxilato de dl-Pirrolidona de Sodio	0,5
Aceite de Ricino Hidrogenado con PEG-60	0,5
Goma de Xantano	0,4
Hialuronato Sódico	0,1
Fragancia	0,1
Parabeno	0,1
Ácido Cítrico	0,08
Citrato Sódico	0,08
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 3: Leche Corporal

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	5,0
1,3-Butilenglicol	12,0
Aceite de Oliva	8,0
Etanol	3,0
Metil Polisiloxano	2,0
Ácido Esteárico	1,0
Triglicérido Caprílico/Cáprico	1,0
Alcohol Butilo	1,0
Fenoxietanol	0,7
Polímero de Carboxivinilo	0,2
Hidróxido Potásico	0,2
Lecitina	0,1
Hialuronato Sódico	0,1

Ingredientes	Contenido (%)
Fragancia	0,1
Parabeno	0,1
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 4: Crema

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	10,0
Glicerina	10,0
Aceite de Oliva	8,0
Escualeno	6,0
Monoestearato de Poliglicerilo	4,0
Monoestearato de Glicerilo Lipófilo	4,0
Ácido Esteárico	4,0
Cetanol	3,0
Etanol	3,0
1,2-Hexanodiol	1,0
Fenoxietanol	0,9
Metil Polisiloxano	0,7
Hidróxido Potásico	0,6
Polímero de Carboxivinilo	0,2
Fragancia	0,1
Carboxilato de dl-Pirrolidona de Sodio	0,1
Parabeno	0,1
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 5: Crema

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	5,0
Glicerina	10,0
Aceite de Oliva	8,0
Escualeno	6,0
Monoestearato de Poliglicerilo	4,0
Monoestearato de Glicerilo Lipófilo	4,0
Ácido Esteárico	4,0
Cetanol	3,0
Etanol	3,0
Fenoxietanol	0,9
Metil Polisiloxano	0,7
Hidróxido Potásico	0,6
Polímero de Carboxivinilo	0,2

Ingredientes	Contenido (%)
Fragancia	0,1
Carboxilato de dl-Pirrolidona de Sodio	0,1
Parabeno	0,1
1,2-Hexanodiol	1,0
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 6: Espuma Limpiadora

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	0,1
Ácido Mirístico	15,0
Ácido Palmítico	12,0
Ácido Esteárico	10,0
Hidróxido Potásico	8,0
Glicerina	5,0
1,3-Butilenglicol	4,0
Ácido Láurico	3,0
Cera de abejas Blanca	2,0
Etanol	2,0
1,2-Hexanodiol	1,0
Fenoxietanol	0,9
Fragancia	0,6
Edetato Disódico	0,2
Parabeno	0,1
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

5

Ejemplo de Formulación 7: Gel Limpiador

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	0,1
Glicerina	17,0
DipropilenGlicol	17,0
Cocoato de Glicerilo y PEG-7	15,0
Etanol	5,0
Aceite de Oliva	2,0
Polímero de Carboxivinilo	1,0
Aceite de Nueces de Macadamia	1,0
Fenoxietanol	0,9
Hidróxido Sódico	0,5
Parabeno	0,1
Fragancia	0,1
Agua Purificada	Equilibrio

Ingredientes	Contenido (%)
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 8: Base de Maquillaje

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	1,0
Decametil Ciclopentasiloxano	45,0
Óxido de Cinc	26,0
1,3-Butilenglicol	5,0
Aceite de Oliva	3,0
Óxido de Titanio	2,0
Monoisoestearato de Poliglicerilo	2,0
Glicerina	1,0
Etanol	1,0
Fenoxietanol Poli(Oxietileno/Oxipropileno)	0,8
Copolímero de Metilo y Polisiloxano	0,5
Cloruro Sódico	0,5
Parabeno	0,1
Ácido Cítrico	0,1
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 9: Base en Polvo

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	0,1
Sericita	15,0
Fluorlogopita Sintética	10,0
Óxido de Titanio	10,0
Óxido de Cinc	10,0
Nitrato de Boro	5,0
Óxido de Hierro	5,0
Bengala	2,0
Óxido de Aluminio	1,0
Metil Polisiloxano	1,0
Metilhidrógeno Polisiloxano	1,0
2-Etilhexanoato de Cetilo	1,0
Isoestearato de Glicerilo	0,5
Etanol	0,1
Parabeno	0,1
Fenoxietanol	0,1
Agua Purificada	0,1
Hialuronato Sódico	0,01
Talco	Equilibrio

Ingredientes	Contenido (%)
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 10: Base Líquida

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	0,5
Decametil Ciclopentasiloxano	30,0
Óxido de Titanio	8,0
Óxido de Cinc	5,0
Tri(2-etilhexanoato) de Glicerilo	5,0
1,3-Butilenglicol	5,0
Metil Polisiloxano Cetilmetil Polisiloxano Poli(Oxietileno/ Oxipropileno) Metilo	
Copolímero de Polisiloxano	3,5
Óxido de Hierro	3,0
Triisoestearato de Poliglicerilo	3,0
1,2-Pentanodiol	3,0
Sericita	3,0
Octil Dodecanol	2,0
Diisoestearato de Poliglicerilo	2,0
Etanol	1,0
Cloruro Sódico	0,5
Fenoxietanol	0,5
Ácido Silícico Anhidro	0,1
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 11: Champú

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol Polioxietileno (3 E.O.)	0,1
Lauriléter Sulfato	15,0
Propilenglicol	8,0
Cocamidopropil Betaína	5,0
Dietanolamida de coco	3,0
Fenoxietanol	0,8
Fragancia	0,7
Parabeno	0,1
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 12: Acondicionador del Cabello

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	0,1
Triglicérido Caprílico	5,0

Ingredientes	Contenido (%)
Cloruro de Esteartrimonio	4,0
Propilenglicol	3,0
Polioxietilen (5 E.O.) Oleil Éter	2,5
Cetanol	2,5
Fenoxietanol	0,8
Fragancia	0,5
Parabeno	0,1
Agua Purificada	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 13: Polvo de Baño

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	0,1
Sulfato Sódico	50,0
Óxido de Titanio	1,0
Fragancia	0,7
Hidrogenocarbonato Sódico	Equilibrio
Total	100,0

Ejemplo de Formulación 14: Mascarilla

Ingredientes	Contenido (%)
Colágeno modificado con Retinol	Equilibrio
Hialuronato Sódico	10,0
Total	100,0

5

Aplicabilidad industrial

El colágeno modificado con retinol de la presente invención se puede usar como una composición externa para la piel o un cosmético en forma de lámina en el campo farmacéutico y cosmético.

10

Texto Sin Tabla de Secuencias

La SEQ. ID. No: 1 será el cebador directo para aplicar PCR en tiempo real al gen HAS2 de la ácido hialurónico sintasa.

15

La SEQ. ID. No: 2 será el cebador inverso para aplicar PCR en tiempo real al gen HAS2 de la ácido hialurónico sintasa HAS2.

La SEQ. ID. No: 3 será el cebador directo para aplicar PCR en tiempo real al gen HAS3 de la ácido hialurónico sintasa.

20

La SEQ. ID. No: 4 será el cebador inverso para aplicar PCR en tiempo real al gen HAS3 de la ácido hialurónico sintasa.

Listado de secuencias

<110> NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY; SUNSTAR INC.

25

<120> COLÁGENO MODIFICADO CON RETINOL, MÉTODO PARA PRODUCIR EL MISMO Y COMPOSICIÓN EXTERNA PARA LA PIEL QUE CONTIENE AL MISMO

<130> 670319

30

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

5 <210> 1
<211> 25

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polinucleótido diseñado usado como cebador directo para PCR en tiempo real del gen HAS2

15 <400> 1
agtcattgtac acagccttca gagca 25

<210> 2
<211> 22
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polinucleótido diseñado usado como cebador inverso para PCR en tiempo real del gen HAS2

25 <400> 2
cacctccaac catgggatct tc 22

<210> 3
<211> 19
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polinucleótido diseñado usado como cebador directo para PCR en tiempo real del gen HAS3

35 <400> 3
tcggcgattc ggtggacta 19

<210> 4
40 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

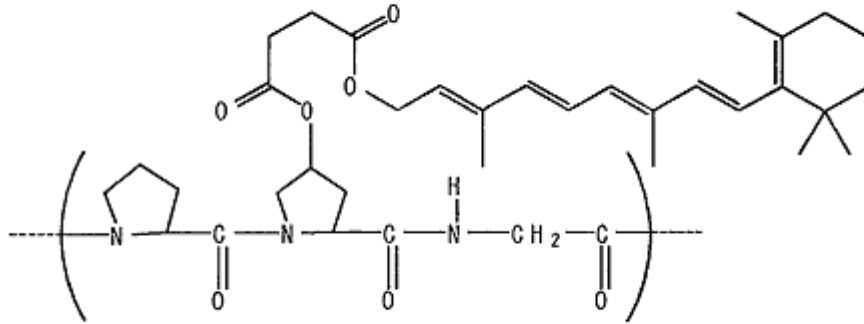
<220>
45 <223> Polinucleótido diseñado usado como cebador inverso para PCR en tiempo real del gen HAS3

<400> 4
cctccaggac tcgaagcatc tc 22

REIVINDICACIONES

1. Un colágeno modificado con retinol que comprende una unidad peptídica representada por la fórmula (2):

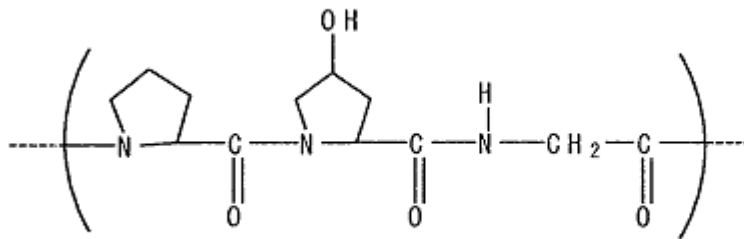
[Fórmula Química 1]



(2) .

y que opcionalmente también comprende al menos un tipo de una unidad peptídica representada por la fórmula (3):

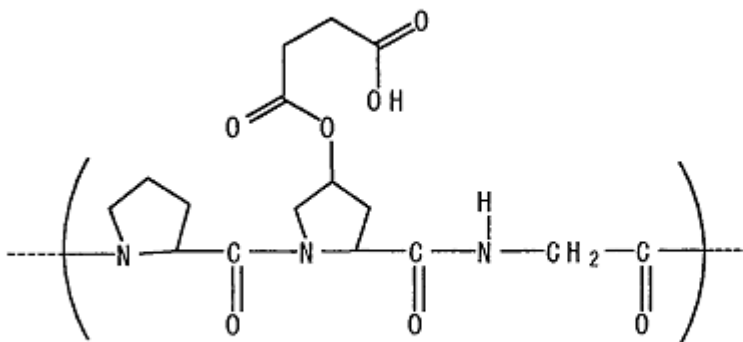
[Fórmula Química 2]



(3)

y una unidad peptídica representada por la fórmula (4):

[Fórmula Química 3]



(4) .

2. El colágeno modificado con retinol de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende al menos un tipo de una unidad peptídica representada por la fórmula (3) o la fórmula (4), donde una proporción del contenido entre la unidad peptídica representada por la fórmula (2), y la unidad peptídica representada por la fórmula (3) y la unidad peptídica

representada por la fórmula (4) está, en términos de proporción molar, en el intervalo de (2) : ((3) + (4)) = 1 : 99 a 100 : 0,

3. El colágeno modificado con retinol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el pico de distribución de peso molecular entra dentro del intervalo de peso molecular de 500 a 1.000.000.

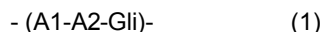
4. El colágeno modificado con retinol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es:

un agente para prevenir la formación de arrugas; y/o un acelerador de la producción de ácido hialurónico; y/o un agente de activación para la ácido hialurónico sintasa; y/o un acelerador de la producción de colágeno.

5. Un método para producir el colágeno modificado con retinol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:

- (1) preparar colágeno conjugado con ácido dicarboxílico mediante unión de ácido succínico o su anhídrido al menos a un grupo hidroxilo del colágeno; y a continuación
- (2) unir el retinol a un grupo carboxilo del ácido succínico del colágeno conjugado con ácido dicarboxílico.

6. El colágeno modificado con retinol de acuerdo con la reivindicación 1 o el método para su producción de acuerdo con la reivindicación 5, donde el colágeno es uno o más tipos seleccionados del grupo que consiste en colágeno natural y colágeno que contiene una unidad peptídica representada por la fórmula (1):



(donde Gli representa glicina, y A1 y A2 representan glicina, prolina (Pro) o hidroxiprolina (Hip), con la condición de que al menos uno de A1 y A2 sea Hip), gelatina, y un hidrolizado de colágeno natural y un hidrolizado de colágeno que contiene una unidad peptídica representada por la fórmula (1).

7. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, donde una amina terciaria se usa como un disolvente en la etapa (2).

8. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 7, donde la amina terciaria es una trialquilamina.

9. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 8, donde la trialquilamina es diisopropiletilamina.

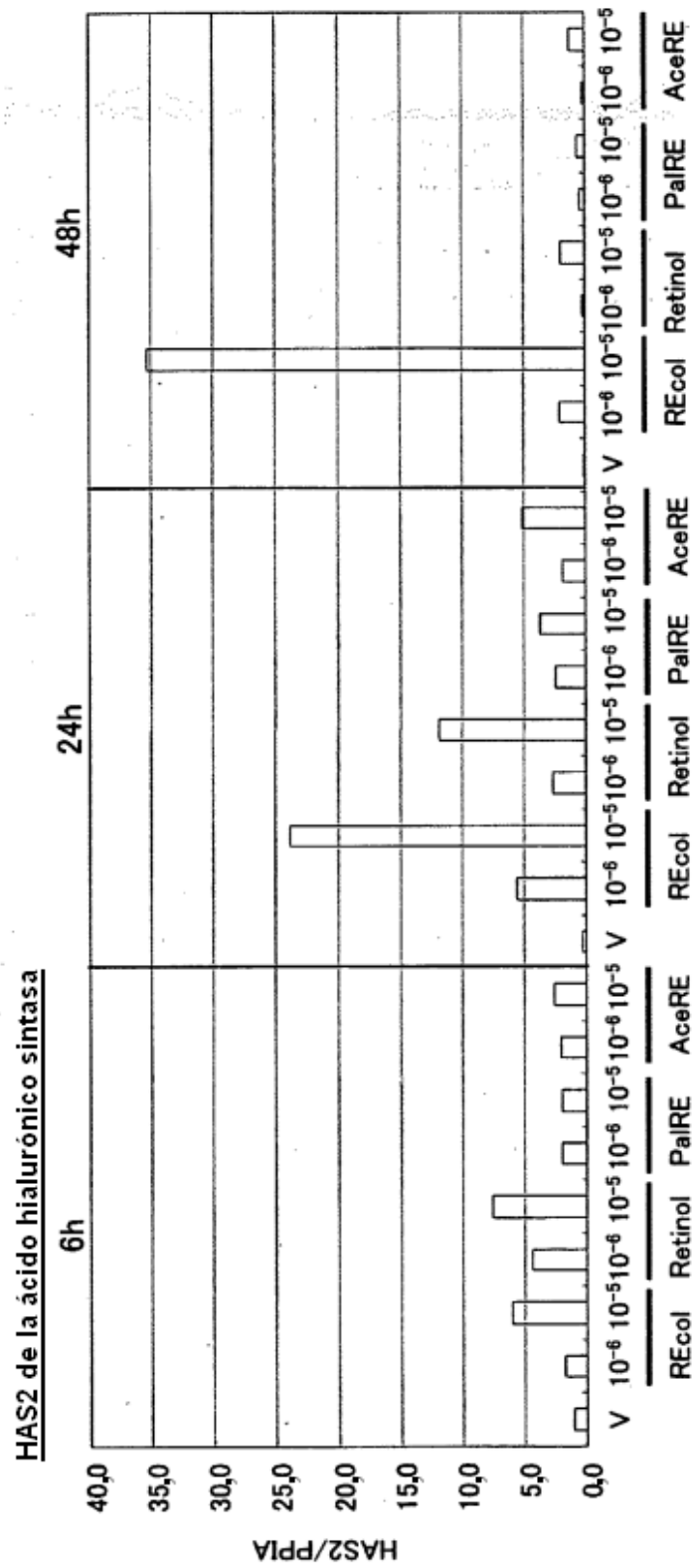
10. Una composición externa para la piel que comprende, como un principio activo, el colágeno modificado con retinol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

11. Una composición externa para la piel que comprende el colágeno modificado con retinol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una cantidad de un 0,00001 a un 30 % en peso, basándose en la cantidad de la composición total.

12. La composición externa para la piel de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que se usa para prevenir la formación de arrugas.

13. Un cosmético en forma de lámina que comprende el colágeno modificado con retinol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

Fig. 1A



HAS3 de la ácido hialurónico sintasa

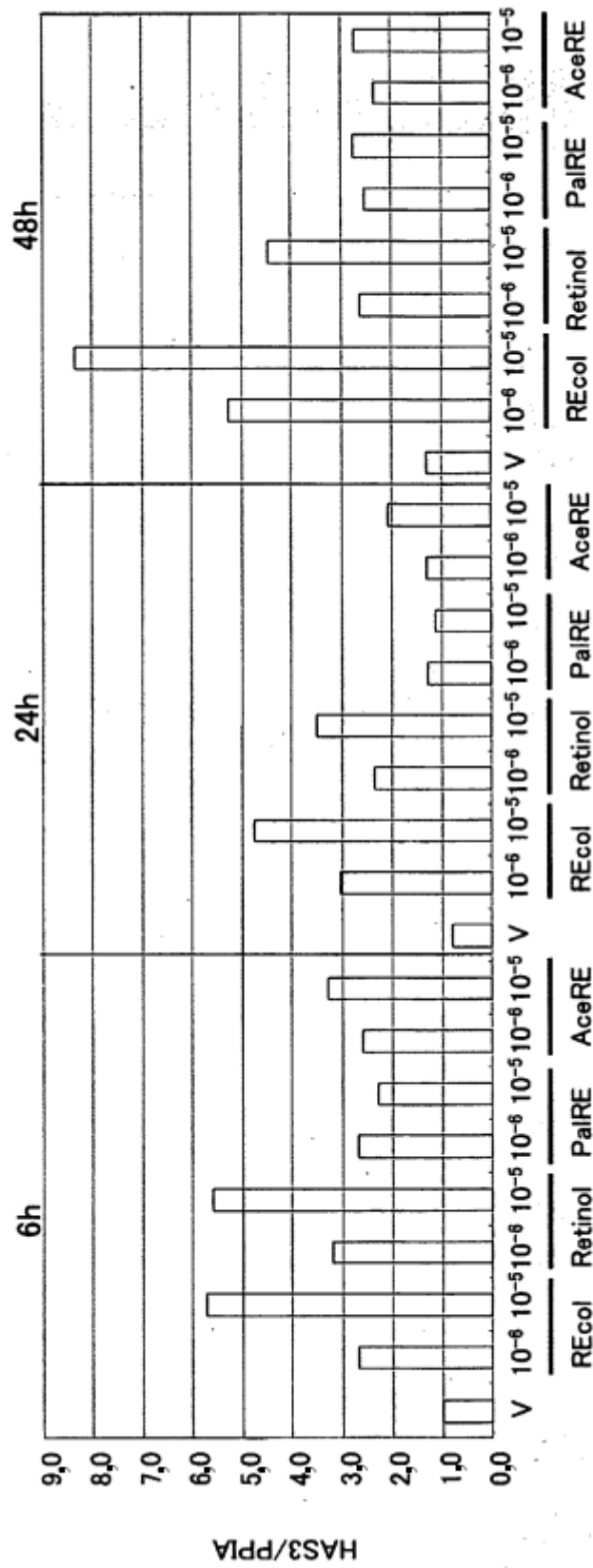
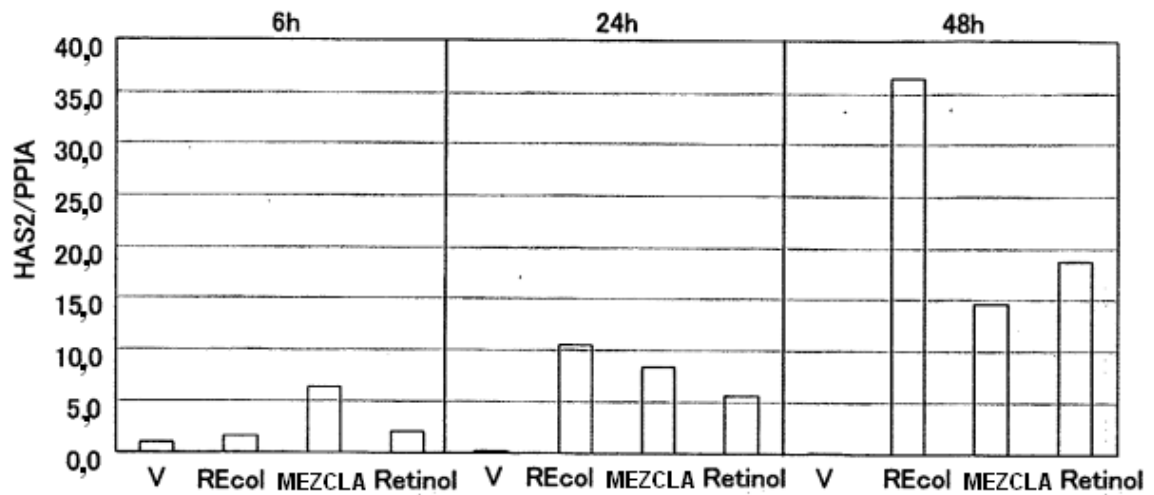


Fig. 2

HAS2 de la ácido hialurónico sintasa



HAS3 de la ácido hialurónico sintasa

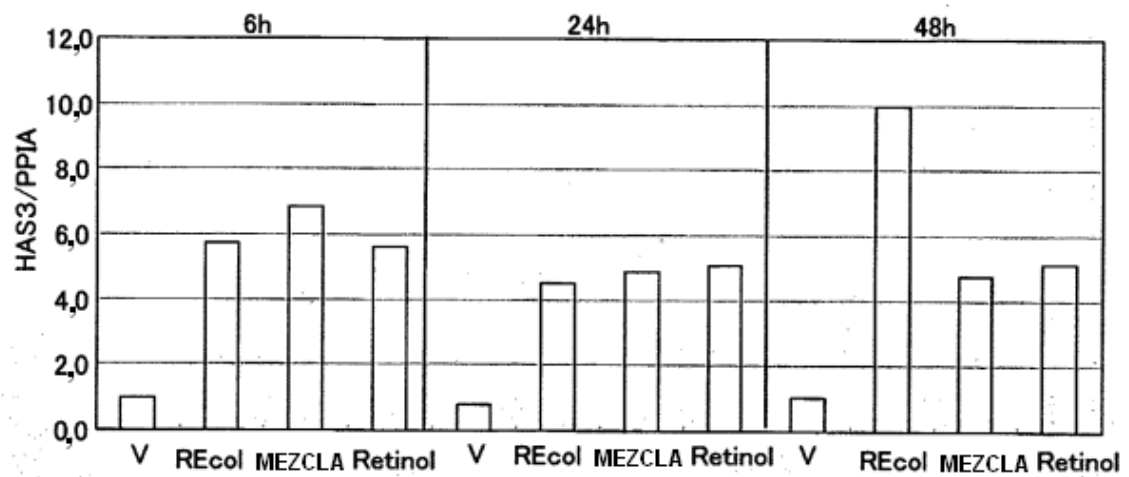


Fig. 3

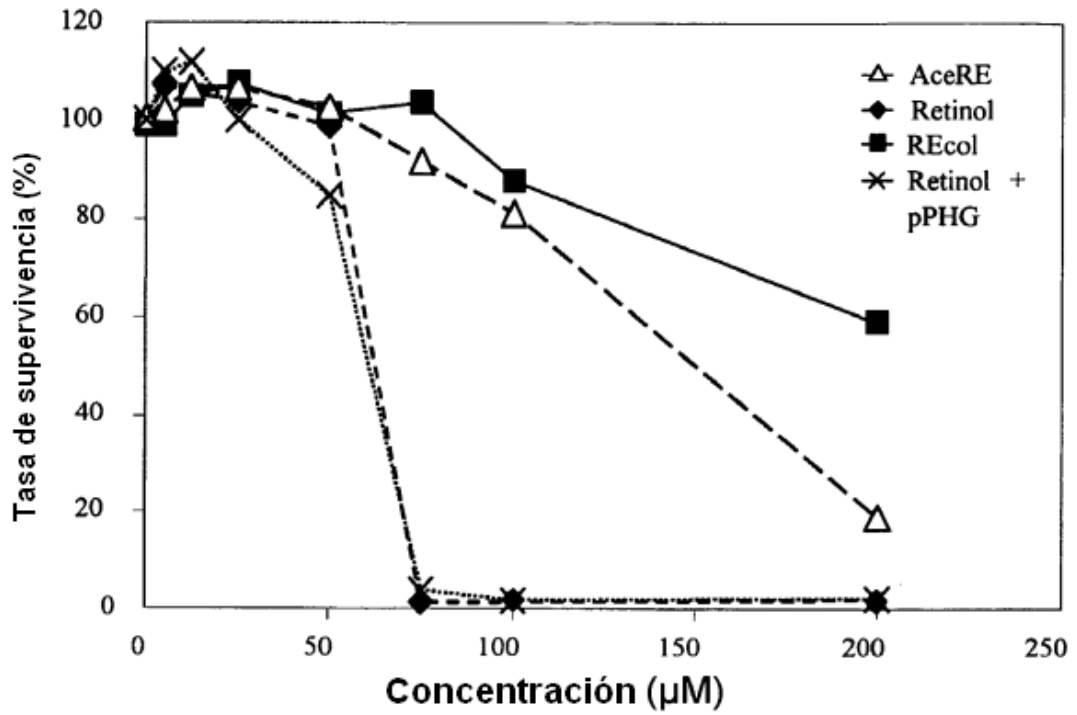


Fig. 4

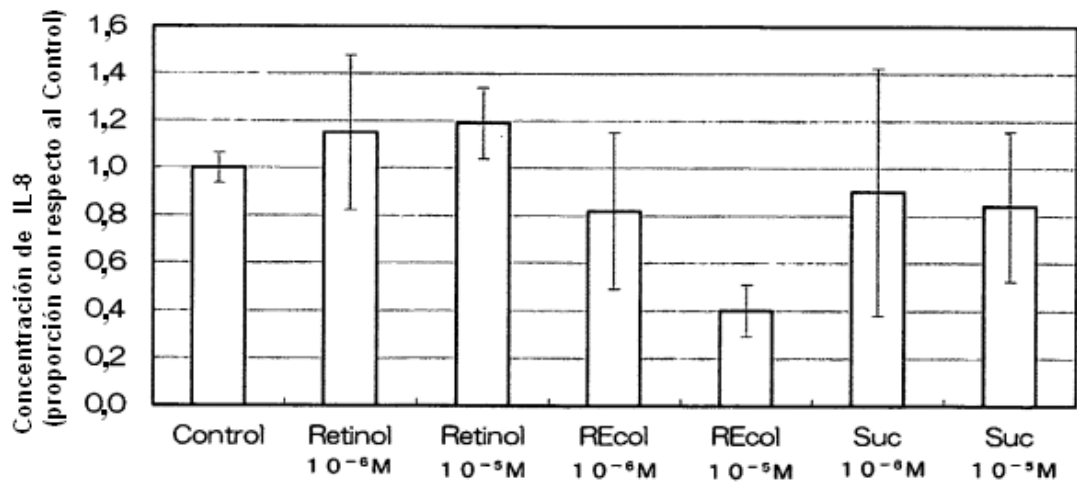


Fig. 5

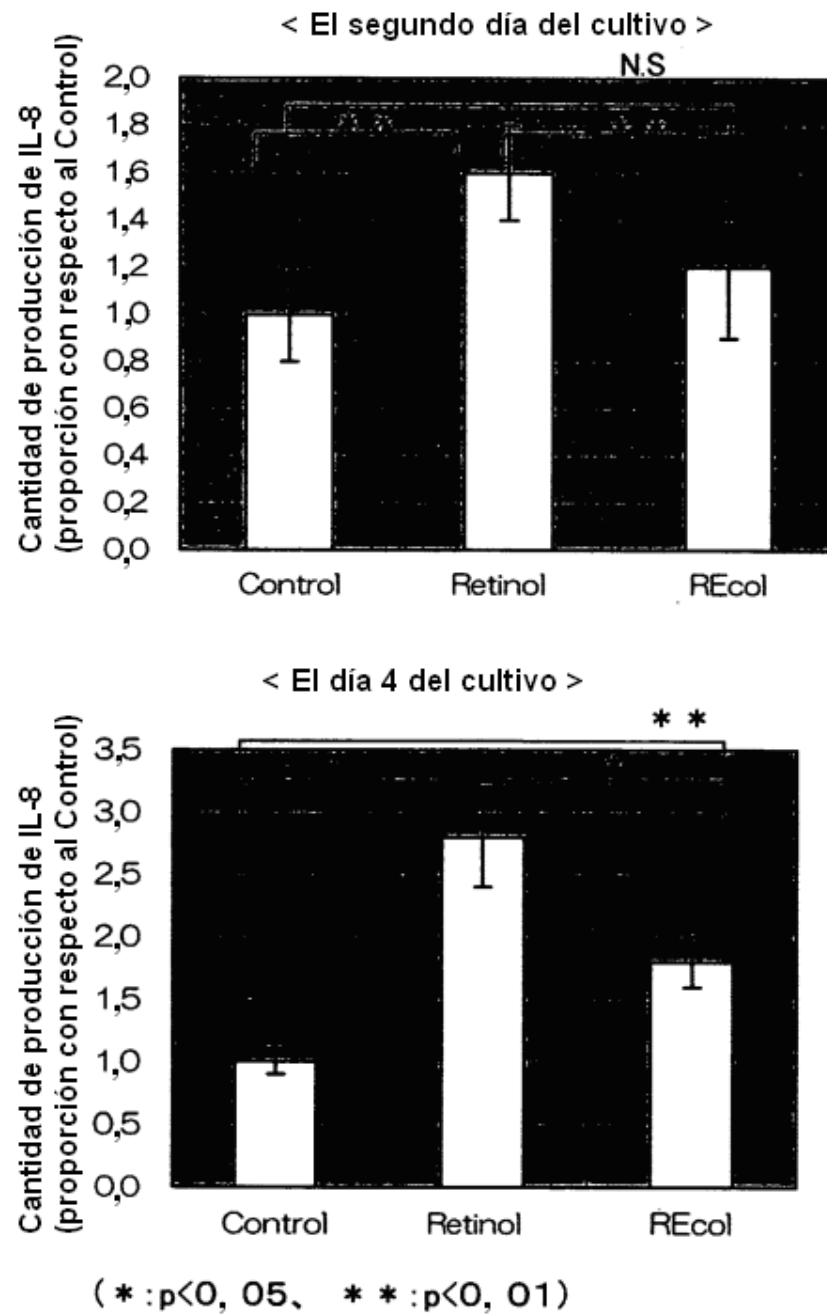
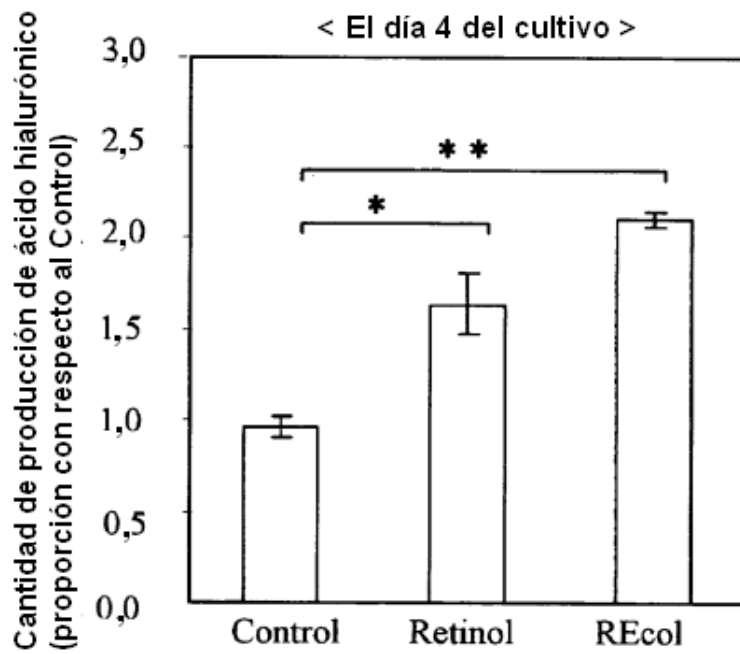
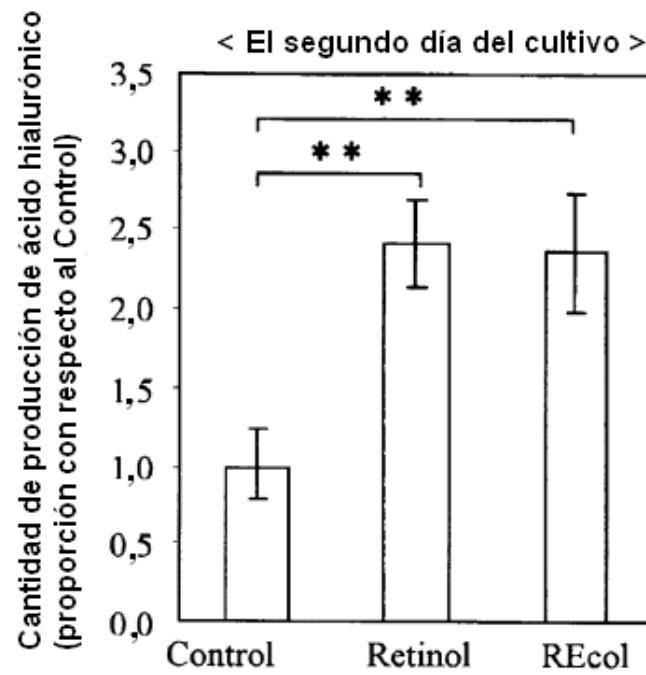
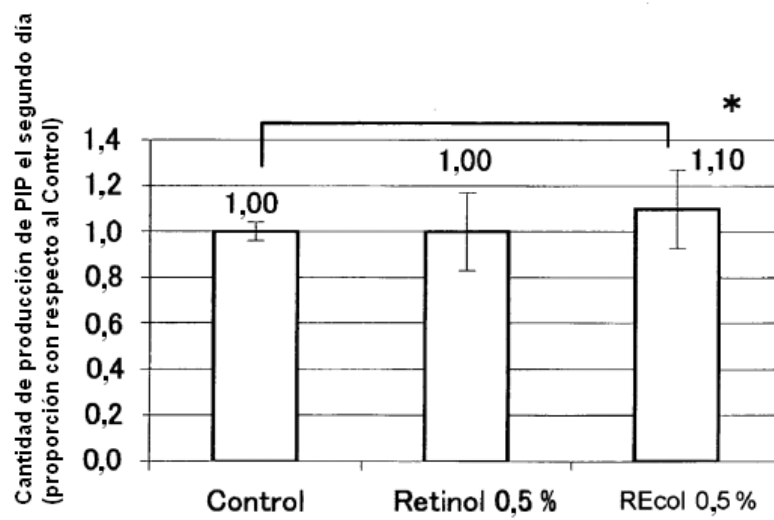
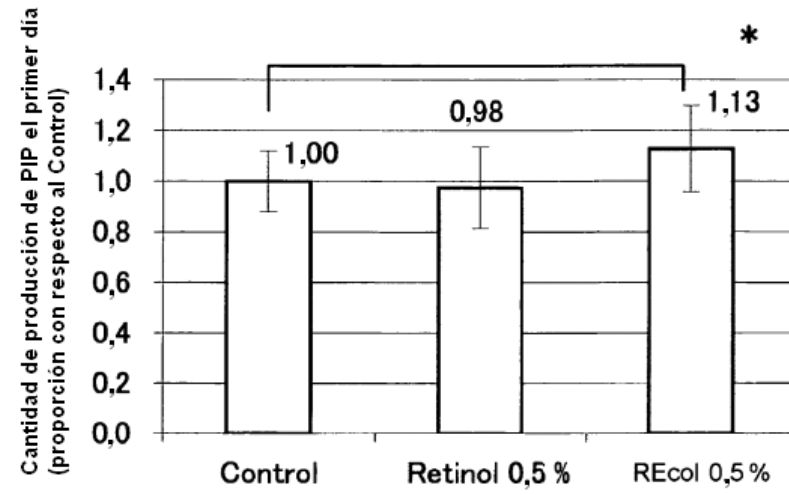


Fig. 6



(* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$)

Fig. 7



(* : $p < 0,05$)